

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
14 de Diciembre de 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 00/74708 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 38/22,
A61P 37/02

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES00/00197

(22) Fecha de presentación internacional:
2 de Junio de 2000 (02.06.2000)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9901235 4 de Junio de 1999 (04.06.1999) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
[ES/ES]; Rectorado, Avenida de Séneca, 2, E-28040
Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): PEREZ

GOMARIZ, Rosa [ES/ES]; Facultad de Ciencias Biológicas,
Departamento de Biología Celular, E-28040 Madrid
(ES). LECETA MARTINEZ, Javier [ES/ES]; Facultad
de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celu-
lar, E-28040 Madrid (ES). DELGADO MORA, Mario
[ES/ES]; Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento
de Biología Celular, E-28040 Madrid (ES). MARTINEZ
MORA, Carmen [ES/ES]; Facultad Ciencias Biológicas,
Departamento de Biología Celular, E-28040 Madrid (ES).

(81) Estados designados (nacional): AU, CA, JP, US.

(84) Estados designados (regional): patente europea (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

Publicada:

— Con informe de búsqueda internacional.

— Con reivindicaciones modificadas y declaración.

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: METHOD FOR TREATING ENDOTOXIC SHOCK AND INFLAMMATORY AND AUTOIMMUNE DISEASES IN
MAMMALS

(54) Título: METODO PARA EL TRATAMIENTO DEL SHOCK ENTOTOXICO Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y
AUTOINMUNES EN MAMIFEROS

(57) Abstract: The invention relates to the utilization of therapeutic agents inhibiting the production of tumoral necrosis factor (TNF) and interleukin 6 (IL-6), which induce high levels of interleukin 4 (IL-4), in the treatment of endotoxic shock and inflammatory and autoimmune diseases in mammals. Said agents are the vasoactive intestinal peptide (VIP), the pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and their corresponding fragments and derivatives.

(57) Resumen: Se describe el uso de agentes terapéuticos que inhiben la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) y de la interleukina 6 (IL-6) y que inducen niveles elevados de interleukina 4 (IL-4), para el tratamiento del shock endotóxico y enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos. Estos agentes son el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el péptido activador de la adenilato ciclase hipofisaria (PACAP), sus respectivos fragmentos y derivados.

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TÍTULO

METODO PARA EL TRATAMIENTO DEL SHOCK ENTOTOXICO Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS Y
AUTOINMUNES EN MAMIFEROS

5

ESTADO DE LA TECNICA

El shock endotóxico es todavía la mayor causa de mortalidad hospitalaria. Las estrategias para combatir los efectos del shock endotóxico se centran en contrarrestar los agentes bacterianos responsables del cuadro, en restaurar los parámetros hemodinámicos, prevenir la activación celular y modificar la acción de los mecanismos de defensa (Boyd O; Current Opinion in Anaesthesiology 1996, 9:98).

Hoy en día se acepta que la respuesta inflamatoria frente a los productos bacterianos contribuye directamente al desarrollo del shock endotóxico (Parillo JE; New England Journal of Medicine 1993, 328:1471). Los productos tóxicos bacterianos y los liberados durante el daño tisular activan los mecanismos de defensa, implicando a células como neutrófilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales, y a mediadores como citoquinas, factor de activación de las plaquetas, metabolitos del ácido araquidónico y óxido nítrico, causando cambios hemodinámicos y orgánicos lesivos para el huésped (Moldawer LL; Critical Care Medicine 1994, 22:3). Muchas citoquinas han sido propuestas como marcadores de la gravedad en el desarrollo del choque séptico. Los niveles circulantes de $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6 e IL-8 se han correlacionado con la probabilidad de superar un episodio séptico. $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 administradas a humanos o a animales experimentales reproducen muchas de las manifestaciones hemodinámicas del choque séptico (Tracey KJ y col.; Science 1986, 234:470) y se ha ensayado su inhibición mediante inyección de receptores antagonistas y anticuerpos monoclonales neutralizantes con resultados diversos (Fisher CJ y col.; Critical Care Medicine 1994, 22:12). Entre los marcadores inmunológicos los niveles circulantes de IL-6 son los

mejores indicadores de la gravedad de la sepsis y de las posibilidades de superación del episodio (Liaw YS y col.; Journal of the Formosan Medical Association 1997, 96:685).

A pesar del avance en el conocimiento de los mecanismos y de los progresos técnicos y farmacológicos hay todavía pocos resultados en una mejora de los datos de mortalidad
5 que se traducen en una cifra de unos 200.000 decesos al año en Estados Unidos y Europa (Vicent J-L y Chamblou R; Current Opinion in Anaesthesiology 1996, 9:146).

Los procesos inflamatorios son un proceso vital para la supervivencia de todos los organismos complejos. De forma natural la inflamación es un proceso de defensa del
10 organismo frente a un agente extraño. La acumulación y activación de leucocitos en los lugares donde se produce la agresión es un acontecimiento central en todo proceso inflamatorio (Schaal TJ y Bacon KB; Current Opinion in Immunology 1994, 6:865). Una respuesta inflamatoria insuficiente puede comprometer la supervivencia del organismo, pero una respuesta excesiva, que puede deberse a fallos en los mecanismos
15 de desactivación del proceso por distintas causas, puede terminar desencadenando una enfermedad inflamatoria o autoinmune (Sacca R y col.; Current Opinion in Immunology 1997, 9:851). Estas enfermedades son una causa importante de morbilidad y mortalidad en los mamíferos por los daños tisulares asociados a dichos procesos.

20 Los macrófagos juegan un papel central en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias. La ejecución de estas actividades está mediada por toda una serie de procesos complejos en los que intervienen, entre otros, muchos productos de origen macrofágico. Como respuesta a los antígenos, y según su origen, los macrófagos secretan citoquinas proinflamatorias y agentes oxidantes, tales como $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β ,
25 IL-12 y óxido nítrico (Laskin DL y col.; Annual Review of Pharmacology and Toxicology 1995, 35:655). $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 son, entre otros, dos factores que contribuyen a los cambios fisiopatológicos asociados con varios estados de inflamación crónica o aguda. Los macrófagos, además, participan en el inicio, mantenimiento y control de las respuestas inmunes, actuando como potentes presentadores de antígenos,

proporcionando a los linfocitos T una doble señal de activación: el complejo antígeno-moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y una señal coestimuladora mediada por moléculas de la familia B7 (Lenschow DJ y col.; Annual Review of Immunology 1996, 14:233). Las moléculas B7 comprenden dos isoformas, B7.1 y B7.2, cada una de ellas implicada en la estimulación de dos tipos de células T colaboradoras (Th) distintas, Th1 y Th2 respectivamente, y cada una de ellas produce un conjunto de citoquinas distintas (Kuchroo VK y col.; Cell 1995, 80:707).

La activación de las células Th1 implica la producción, entre otros factores, de IFN γ e IL-12, está asociada a la producción de anticuerpos de isotipo IgG2a y se manifiesta como una reacción de tipo inflamatorio retardado. La activación de células Th2 implica la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 entre otros factores, está asociado a la secreción de anticuerpos de isotipo IgG1, inhibe la respuesta inflamatoria retardada y se manifiesta como una respuesta humoral (Constant SL y Bottomly K; Annual Review of Immunology 1997, 15:297). Los factores que determinan la diferenciación de uno u otro tipo de respuesta son, principalmente, las características de las células presentadoras de antígenos y las citoquinas presentes en el microambiente en el que se desarrolla la respuesta: IL-12 determina la diferenciación de células Th1 mientras que IL-4 lo hace de Th2. Cuando ambas están presentes predomina el efecto de IL-4 (O'Garra AO; Immunity 1998, 8:275). Numerosos casos de enfermedades inflamatorias y autoinmunes se deben a la activación de un tipo de células Th inadecuado.

El Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) es un péptido básico de 28 aminoácidos cuya secuencia es (Mutt V y Said SI; European Biochemistry 1974, 42:581):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂

Se aisló en primer lugar a partir de intestino delgado porcino y posteriormente se identificó en el cerebro y en terminaciones nerviosas del sistema periférico,

- estableciéndose su naturaleza como neuropéptido con propiedades neuromoduladoras (Fahrenkrug J; *Pharmacology and Toxicology* 1993, 72:354). Su nombre se debe a sus propiedades vasodilatadoras periféricas. También se ha identificado VIP en células cebadas de rata y en granulomas (Cutz E. y col.; *Nature* 1978, 275:661). Estudios
- 5 inmuoquímicos realizados en secciones histológicas de timo, bazo y ganglios linfáticos de rata han identificado VIP inmunoreactivo en linfocitos de estos órganos (Gomariz RP y col; *Annals of the New York Academy of Sciences* 1992, 650:13; Leceta y col.; *Advances in Neuroimmunology* 1996, 6:29).
- 10 El VIP ejerce sus efectos biológicos a través de receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia de siete dominios hidrofóbicos acoplados a proteínas G, las cuales transducen la información hasta las moléculas efectoras finales (Laburthe M y Couvineau A; *Annals of the New York Academy of Sciences* 1988, 527:296). Los receptores para VIP han sido caracterizados en numerosos tejidos como hígado y tejido
- 15 adiposo entre otros y que corresponden a dos tipos, los llamados VIP1 -R (Ishihara T y col.; *Neuron* 1992, 8:811) y VIP2-R (Lutz E. y col.; *FEBS Letters* 1993, 334:3). En el sistema inmune se han caracterizado receptores específicos para VIP en una variedad de células inmunes que incluyen linfocitos periféricos humanos, monocitos humanos, linfocitos de rata y de ratón, macrófagos alveolares de rata y macrófagos peritoneales de
- 20 rata y ratón (Gomariz RP y col.; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994, 203:1599; Delgado M y col.; *Regulatory Peptides* 1996, 62:161). El VIP modula una gran variedad de funciones inmunes como son la función fagocítica, en cada una de las etapas del proceso, la respuesta proliferativa, la producción de inmunoglobulinas, la actividad NK y la producción de citoquinas (De La Fuente M y
- 25 col.; *Advances in Neuroimmunology* 1996, 6:75).

El péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) es un miembro de la familia de péptidos de la secretina/VIP/glucagon del que se conocen dos formas

moleculares PACAP-38 y PACAP-27, cuyas secuencias son respectivamente (Ogi K y col.; Biochemical and Biophysical Research communication 1993, 196:1511):

PACAP-38

5 His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Thy-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH₂

PACAP-27

10 His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Thy-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH₂

Ambos péptidos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico.

15 También hay células productoras de PACAP en pulmón, células B pancreáticas e intestino (Arimura A; Regulatory Peptides 1992, 37:287). En el sistema inmune se ha descrito una gran abundancia de células positivas para PACAP en órganos linfoides centrales y periféricos (Gaytan F y col.; Cell and Tissue Research 1994, 276:233). Para el PACAP se han descrito tres tipos de receptores (Shivers BD y col.; Endocrinology 1991, 20 128:3055; Inagaki N y col.; Proceeding of the National Academy of Sciences USA 1994, 91:2679) : el receptor de PACAP tipo I (PACAP-R-I) con igual afinidad para el PACAP-38 y el PACAP-27, pero que posee una afinidad de 300 a 1000 veces menor por el VIP ; el receptor de PACAP tipo II (PACAP-R-II) que reconoce con la misma 25 afinidad al VIP, PACAP-38 y PACAP-27 por lo que se le denomina receptor común de VIP-PACAP y corresponde al receptor de VIP VIP1-R, y el receptor de PACAP tipo III (PACAP-R-III) que corresponde al receptor de VIP VIP2-R. Hasta el momento, son escasos los estudios sobre las acciones biológicas del PACAP en el sistema inmune. Los

efectos del PACAP son en muchos casos similares a los del VIP modulando la función fagocítica y las respuestas proliferativas.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

5

El objeto de esta invención es desarrollar preparados de VIP, PACAP y análogos como agentes terapéuticos en el tratamiento del shock endotóxico y enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

- 10 El tratamiento consiste en la administración a mamíferos, que lo necesiten, de una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) o de IL-6 en un vehículo farmacéuticamente aceptable, o bien la administración a mamíferos, que lo necesiten, de una cantidad efectiva de un agente que aumente la producción de IL-4, inhibiendo la activación de células Th1 y estimulando la activación
- 15 de células Th2.

Se sabe que la mayoría de los efectos del shock endotóxico están mediados por la activación del sistema inmune y los mecanismos inflamatorios del huésped como respuesta a los productos bacterianos. Los macrófagos juegan un papel muy relevante en

20 este proceso pues tras su activación producen factores como óxido nítrico, prostaglandinas y citoquinas responsables de síntomas tales coma fiebre, hipotension, microcoagulacion diseminada, fallo organico multiple y eventualmente la muerte. En este sentido se han descrito elevados niveles circulantes de TNF, IL-1 e IL-6 asociados a endotoxemia. En modelos animales estos sintomas se reproducen tanto por la

25 administration de endotoxinas bacterianas (LPS) como por la inyección de TNF e IL-1. Otros estudios han puesto de manifiesto el valor diagnostico en cuanto a probabilidad de supervivencia que representan los niveles circulantes de IL-6 (Stoiser B y col.; European Journal of Clinical Investigation 1998, 28:672).

El factor de necrosis tumoral (TNF) es producido por varios tipos celulares que incluyen monocitos y macrófagos, linfocitos T y B, neutrófilos, células cebadas, células tumorales y fibroblastos. Es un importante factor regulador de otras citocinas pro-inflamatorias, como son IL-1 β , IL-6 e IL-8. El TNF α induce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, activa a los leucocitos para que destruyan los microorganismos, actúa sobre los hepatocitos para aumentar la síntesis de proteínas séricas que contribuyen a la respuesta de fase aguda y activa el sistema de coagulación. Su sobreproducción conduce a enfermedades inmunopatológicas, autoinmunidad e inflamación.

La IL-6 es una citoquina multifuncional producida tanto por linfocitos como por células no linfoides. Regula varios aspectos de la respuesta inmune, como la producción de proteínas que median la fase aguda y la hematopoyesis. Además actúa como mediador en la respuesta inflamatoria. Su producción esta regulada por varios factores, que incluyen TNF α , IL-1 y endotoxina bacteriana (LPS).

La IL-4 es una citoquina que inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos B activados y aumenta la expresión de moléculas MHC de tipo II en linfocitos B. Se ha puesto de relieve su posible utilización clínica en tratamientos antiinflamatorios y enfermedades autoinmunes.

Se han ensayado estrategias de neutralización de citoquinas proinflamatorias en el tratamiento del shock endotóxico pero los resultados no muestran que se produzca una mayor supervivencia a largo plazo. Un tratamiento que inhiba la producción de TNF α e IL-6 representaría una considerable mejora en la evolución del shock endotóxico y en las probabilidades de supervivencia. La administración de VIP y PACAP en modelos animales consigue estos efectos y nuestro invento consiste en la utilización de un

tratamiento con estos neuropéptidos para aumentar la supervivencia en cuadros de shock endotoxico y revertir estados inflamatorios patológicos y enfermedades autoinmunes.

El VIP y el PACAP tienen efectos antiinflamatorios e inhiben la producción de IL-6 y TNF α en modelos animales de inducción de shock endotóxico. Al jugar estas citoquinas un papel importante en el desarrollo de dicho síndrome, VIP y PACAP pueden utilizarse para regular su producción. Además VIP y PACAP modulan la capacidad de las células presentadoras de antígenos para actuar induciendo la activación proliferación y diferenciación de linfocitos con un patrón de secreción de citoquinas típico de las células Th2 y condicionan las respuestas inmunes "in vivo" favoreciendo el desarrollo de respuestas de tipo humoral.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa la producción de TNF α por parte de macrófagos murinos en cultivo (5×10^5 células/ml) estimuladas con 10ngr/ml de LPS en presencia o ausencia de 10^{-8} M de VIP o PACAP a lo largo de 24 horas.

La Figura 2 representa la producción de TNF α por parte de macrófagos murinos en cultivo (5×10^5 células/ml) después de 6 horas en cultivo con 10ngr/ml de LPS y a los que se añadió, a distintos tiempos, 10^{-8} M de VIP o PACAP.

La Figura 3 representa la producción de IL-6 por parte de macrófagos murinos en cultivo (5×10^5 células/ml) estimuladas con 10ngr/ml de LPS en presencia o ausencia de 10^{-8} M de VIP o PACAP a lo largo de 24 horas.

La Figura 4 representa la producción de IL-6 por parte de macrófagos murinos en cultivo (5×10^5 células/ml) después de 6 horas en cultivo con 10ngr/ml de LPS y a los que se añadió, a distintos tiempos, 10^{-8} M de VIP o PACAP.

La Figura 5 presenta el análisis por Northern blot para la presencia de mRNA de TNF α e IL-6 en macrófagos estimulados con LPS en presencia o ausencia de VIP o PACAP (18S representa el correspondiente rRNA como control de la cantidad total de RNA cargada).

La Figura 6 representa la supervivencia de ratones inyectados con 400 μ gr. de LPS y simultáneamente o a los 30 minutos, 1 o 4 horas con 5nmol. de VIP o PACAP.

A. Control; B: VIP a 0h.; C: VIP a 0,5 h; D: VIP a 1 h.; E: VIP a 4 h.

La Figura 7 representa el número de células secretoras de IL-4 en bazo y peritoneo detectadas mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción en placa conjugado con enzima (ELISPOT) en ratones inmunizados en las condiciones especificadas en el Ejemplo 7 y que simultáneamente a la segunda inyección del antígeno recibieron 5nmol de VIP o PACAP o una inyección de solución salina.

La Figura 8 representa la cantidad de inmunoglobulinas anti-hemocianina de caracol (anti-KLH) de los isotipos IgG2a e IgG1 detectables en suero mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción conjugado con enzima (ELISA) en ratones inmunizados en las condiciones especificadas en el Ejemplo 8 y tomadas las muestras de suero dos semanas después de la última inyección.

La Figura 9 representa el número de células productoras de IL-4 detectadas mediante la técnica de ELISPOT en ratones que fueron inmunizados en las condiciones especificadas en los Ejemplos 7 y 8 y que en la segunda inyección recibieron o no 5nmol de VIP junto con 100 μ gr de IgG, anti-B7.1 o anti-B7.2.

MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION

Los ejemplos que siguen son solo para ilustrar los resultados conseguidos y no limitan la utilización del invento que se detallan en las reivindicaciones especificadas.

EJEMPLO 1

5

VIP y PACAP inhiben la producción de TNF α en macrófagos estimulados con LPS

En experimentos realizados “in vitro” VIP y PACAP inhiben la producción de TNF α en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. El mayor grado de inhibición alcanza valores cercanos al 60% y se produce con dosis de estimulación entre 1-10 ngr./ml de LPS. La IC₅₀ es de unos 80 pM, tanto para VIP como para PACAP y su efecto se observó hasta el final del experimento (ver Figura 1). El efecto inhibitor es el mismo si ambos neuropéptidos se añaden hasta 1 hora después de estimular los macrófagos con LPS, aunque disminuye progresivamente hasta desaparecer si se añaden después de 4 horas (ver Figura 2).

15

EJEMPLO 2

VIP y PACAP reducen los niveles circulantes de TNF α después de la inyección de LPS

20

En un experimento realizado con ratones los niveles circulantes de TNF α 2 horas después de la inyección de 25 μ gr. de LPS se aproximaron a los 4 ngr./ml. La administración simultánea de 5nmol de VIP o PACAP redujeron dichos niveles un 60%.

EJEMPLO 3

25

VIP y PACAP inhiben la producción de IL-6 en macrófagos estimulados con LPS

En experimentos realizados “in vitro” VIP y PACAP inhiben la producción de IL-6 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. El mayor grado de inhibición

30

alcanza valores cercanos al 90% y se produce con dosis de estimulación de 10 μ gr./ml de LPS. La IC_{50} es de 8.6 pM, tanto para VIP como para PACAP y su efecto se observó hasta el final del experimento (ver Figura 3). El efecto inhibidor también se observa si los neuropéptidos se añaden después de la estimulación con LPS, aunque el grado de inhibición es progresivamente menor (ver Figura 4).

EJEMPLO 4

VIP y PACAP reducen los niveles circulantes de IL-6 después de la inyección de LPS

10

En un experimento realizado con ratones los niveles circulantes de IL-6 dos horas después de la inyección de 25 μ gr. de LPS se aproximaron a 1.5 ngr./ml. La administración simultanea de 5nmol de VIP o PACAP redujeron dichos niveles un 60% y un 75% respectivamente.

15

EJEMPLO 5

VIP Y PACAP regulan la uroduccion de $TNF\alpha$ e IL-6 a nivel transcriptional

Se sometieron macrófagos de ratón a las condiciones experimentales de los ejemplos 1 y 3 y se aisló su mRNA, que después se analizo mediante Northern blot para detectar mRNA de $TNF\alpha$ e IL-6. La Figura 5 muestra la ausencia de transcritos para $TNF\alpha$ o IL-6 cuando los macrófagos activados con LPS son expuestos además a VIP o PACAP.

EJEMPLO 6

VIP y PACAP protegen de los efectos letales de LPS

Se realizo un experimento en el que se estudio la supervivencia a lo largo de un periodo de 4 días en ratones después de inyectarles 400µgr. de LPS. Los resultados se reflejan en la Figura 6. La mortalidad en estas circunstancias fue del 100% a las 36 horas. Con la administración simultanea de 5 nmol. de VIP o PACAP se consiguió una supervivencia del 60% al final del experimento. La administración de los neuropeptidos hasta 1 hora después de la inyección de LPS todavía registró tasas de supervivencia cercanas al 50%.

EJEMPLO 7

10 VIP y PACAP aumentan la proporción de células secretoras de IL-4.

Grupos de ratones fueron inmunizados con 50 µgr de KLH emulsionados en un adyuvante, repitiéndose la inyección con 100 µgr de KLH dos semanas después e inyectando simultáneamente 5 nmol/ratón de VIP, PACAP o solución salina. Dos semanas después de la última inyección se realizaron suspensiones celulares de bazo y peritoneo que fueron cultivadas durante 24 horas en presencia de 50 µgr/ml de KLH, tras lo cual se determinó el número de células productoras de IL-4 mediante la técnica de ELISPOT. En los ratones inyectados con VIP o PACAP el número de células productoras de IL-4 aumentó del orden de 20 veces sobre los que no fueron tratados con estos neuropéptidos (ver Figura 7).

EJEMPLO 8

25 VIP y PACAP inducen la producción de anticuerpos del isotipo IgG1.

Grupos de ratones fueron inmunizados con 50 µgr de KLH emulsionados en un adyuvante, repitiéndose la inyección con 100 µgr de KLH dos semanas después e inyectando simultáneamente 5 nmol/ratón de VIP, PACAP o solución salina. Dos semanas después de la última inyección se determinaron los niveles de anti-KLH y su

isotipo mediante ELISA específico para los isotipos IgG1 e IgG2a. En los ratones inyectados con VIP o PACAP los anticuerpos anti-KLH detectables en suero dos semanas después de la última inmunización son solamente del isotipo IgG1, mientras que en los que solamente recibieron solución salina fueron del isotipo IgG2a (ver Figura 8)

EJEMPLO 9

El aumento de la proporción de células productoras de IL-4 mediado por VIP y PACAP está relacionado con la expresión de B7.2 inducida por ambos neuropéptidos.

Grupos de ratones fueron inmunizados en las mismas condiciones de los Ejemplos 7 y 8, pero en el momento de la segunda inmunización con KLH los ratones que fueron inyectados simultáneamente con VIP o PACAP recibieron al mismo tiempo 100 µgr de anticuerpo anti-B7.1, anti-B7.2 o la misma cantidad de IgG como control. En los ratones que recibieron anticuerpos anti-B7.2 simultáneamente a la administración de los neuropéptidos el número de células productoras de IL-4 se redujo a la proporción alcanzada en los animales que no fueron inyectados con los neuropéptidos (ver Figura 9).

REIVINDICACIONES

- 1.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos caracterizado porque comprende la administración de una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5
- 2.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos según la reivindicación 1, caracterizado porque el agente inhibidor es el péptido intestinal vasoactivo (VIP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.
10
- 3.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos, según la reivindicación 1, caracterizado porque el agente inhibidor es el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.
15
- 4.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos caracterizado porque comprende la administración de una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la producción de la interleuquina 6 (IL-6) en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
20
- 5.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos según la reivindicación 4, caracterizado porque el agente inhibidor es el péptido intestinal vasoactivo (VIP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.
- 25 6.- Método para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos, según la reivindicación 4, caracterizado porque el agente inhibidor es el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.

7.- Método para el tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes en mamíferos, caracterizadas por la activación de células Th1, que comprende la administración de una dosis efectiva de un agente, en un vehículo farmacéuticamente adecuado, que induzca elevados niveles de IL-4.

5

8.- Método para el tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes en mamíferos según la reivindicación 7, caracterizado porque el agente inductor es el péptido intestinal vasoactivo (VIP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.

10 9.- Método para el tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes en mamíferos según la reivindicación 7, caracterizado porque el agente inductor es el péptido activador de la adenilato ciclasa hipotisaria (PACAP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.

REIVENDICATIONES

[recibidas el 23 de Octubre de 2000 (23.10.00)]

reivendicaciones 1 a 9 reemplazadas por las nuevas reivendicaciones 1 a 4 (1 página)]

1.- Uso del péptido intestinal vasoactivo (VIP) o algunos de sus fragmentos o algún análogo derivado para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento del shock endotóxico en mamíferos, debido a su capacidad como agentes inhibidores de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) y de la interleuquina 6 (IL-6).

2.- Uso del péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) o algunos de sus fragmentos o algún análogo derivado para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento del shock endotóxico en mamíferos, debido a su capacidad como agentes inhibidores de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) y de la interleuquina 6 (IL-6).

3.- Uso del péptido intestinal vasoactivo (VIP) o algunos de sus fragmentos o algún análogo derivado para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes caracterizadas por la activación de células Th1, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, reacción injerto contra huésped y otras, debido a su capacidad como agentes inhibidores de las células Th1.

4.- Uso del péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) o algunos de sus fragmentos o algún análogo derivado para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes caracterizadas por la activación de células Th1, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, reacción injerto contra huésped y otras, debido a su capacidad como agentes inhibidores de las células Th1.

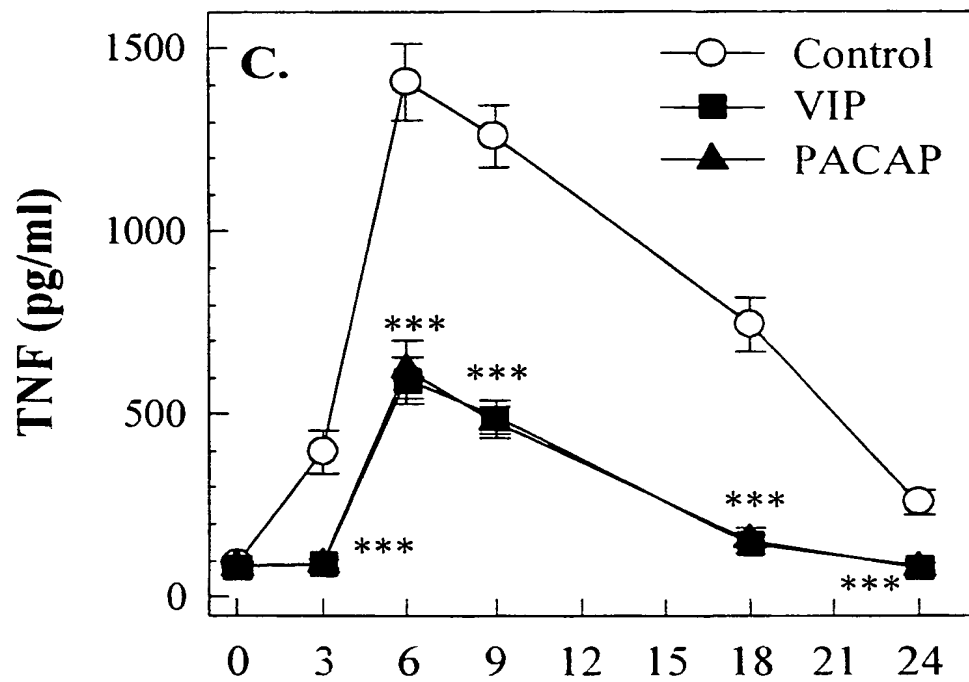
Declaración según el artículo 19(1)

Los firmantes de la solicitud PCT/ES00/00197, a la vista del informe de búsqueda internacional declaran que dicha solicitud se presentó como adición a la solicitud de patente nº 9800814 (PCT/ES99/00101) con fecha 2 de junio de 1999. Las reivindicaciones de la solicitud PCT/ES99/00101 fueron modificadas (12-04-2000) tras el informe sobre el estado de la técnica emitido por la Oficina Española de Patentes y Marcas, quedando reducidas a dos. La patente española (ES2138561) apareció publicada en el mes de julio de 2000 en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial. Corresponde pues reflejar dichas modificaciones en la solicitud PCT/ES00/00197 que, como se ha indicado, se presentó como adición a la PCT/ES99/00101.

- i. Las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 son sustituidas por las reivindicaciones 1 y 2 nuevas.
- ii. Las reivindicaciones 7 y son sustituidas por las reivindicaciones 3 y 4 nuevas.
- iii. Como consecuencia el número de reivindicaciones se reducen a 4 reivindicaciones.

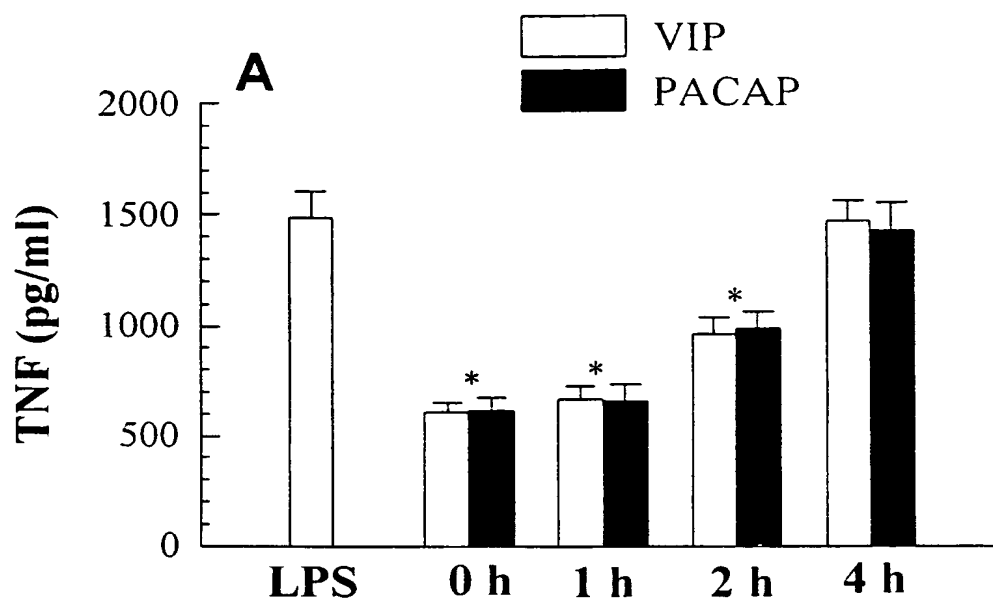
La hoja numero 15 desaparece.

THIS PAGE BLANK (USPTO).

**FIGURA 1**

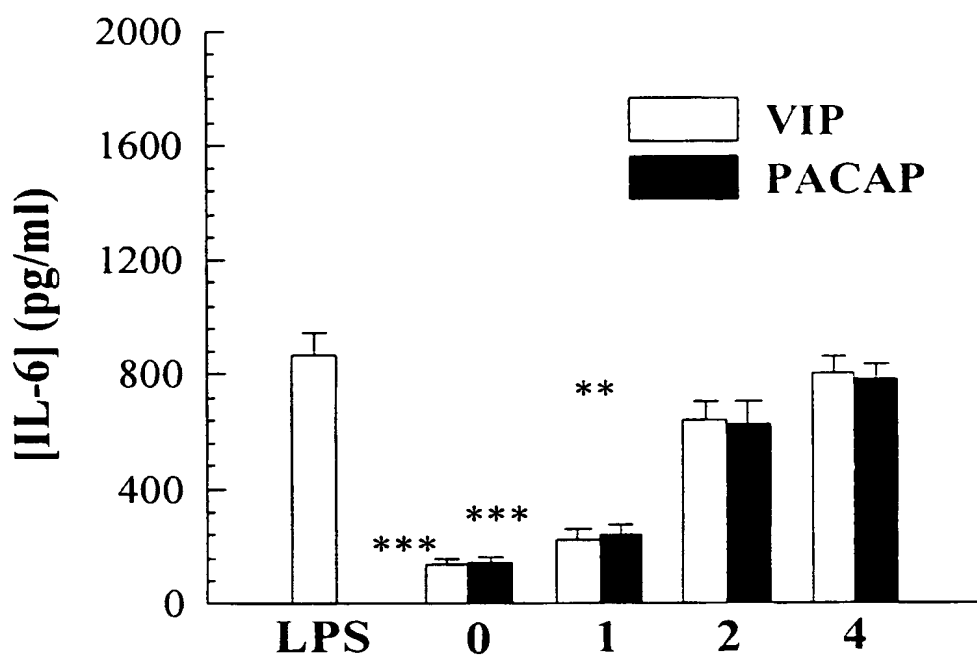
THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 9

**FIGURA 2**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/9

**FIGURA 3**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/9

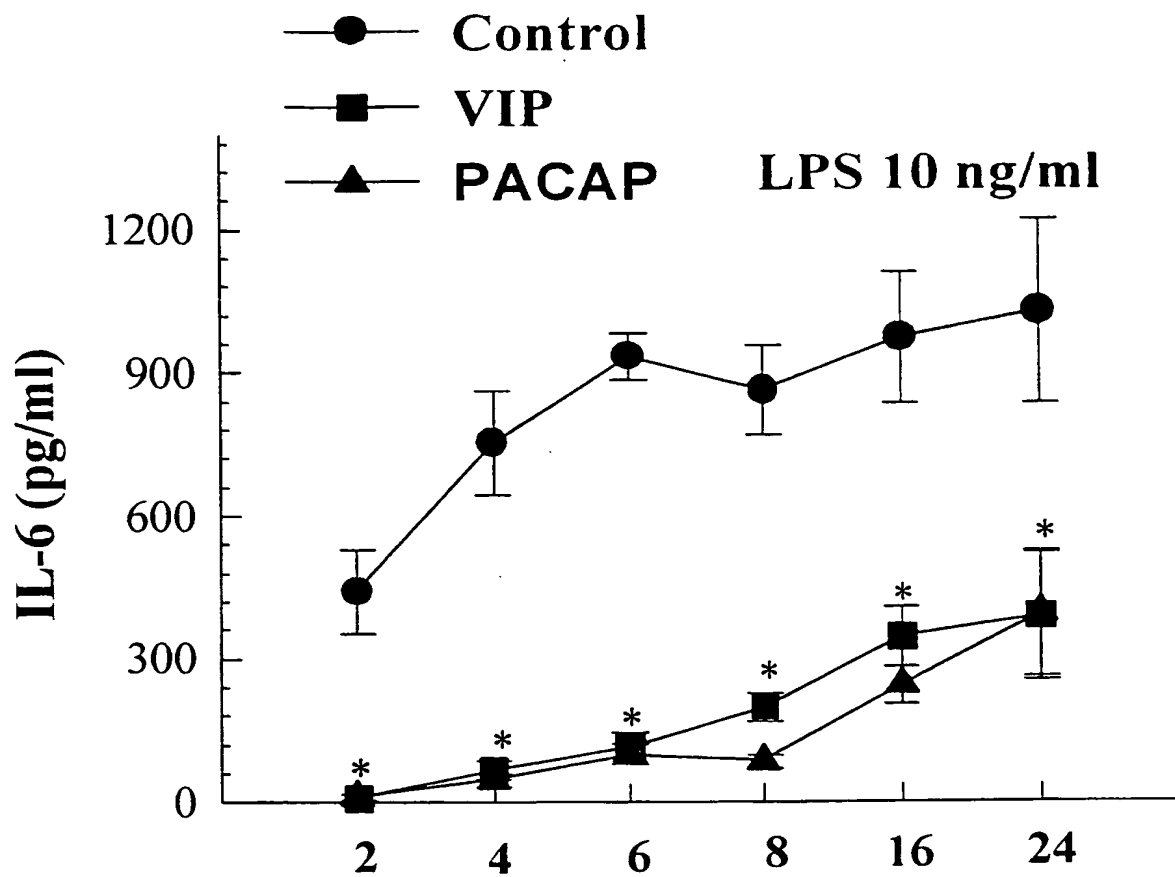


FIGURA 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/9

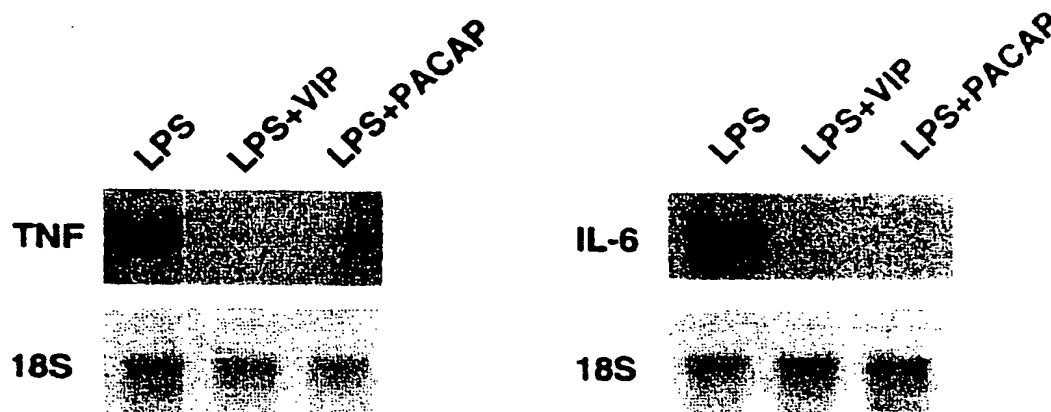


FIGURA 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/9

Supervivencia (%)

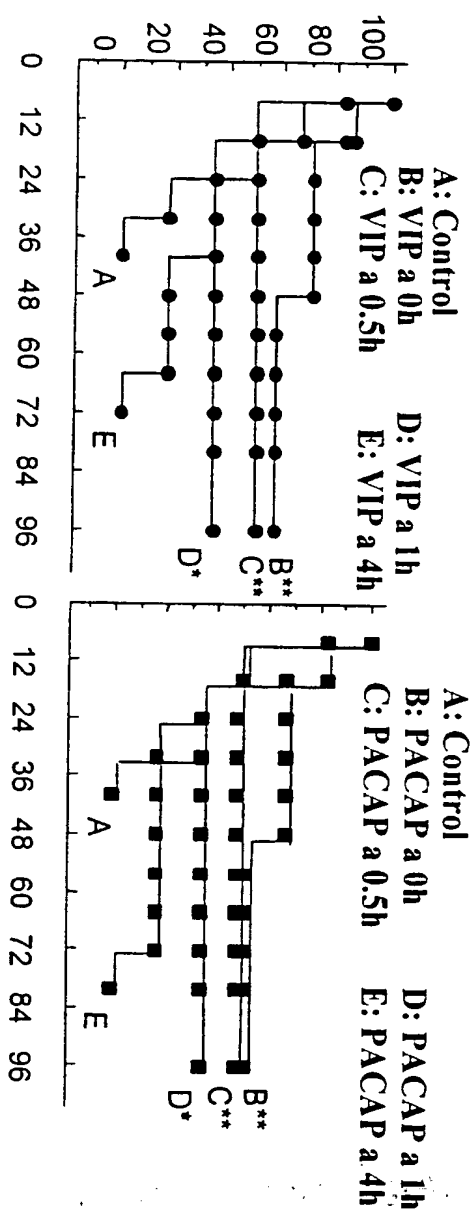
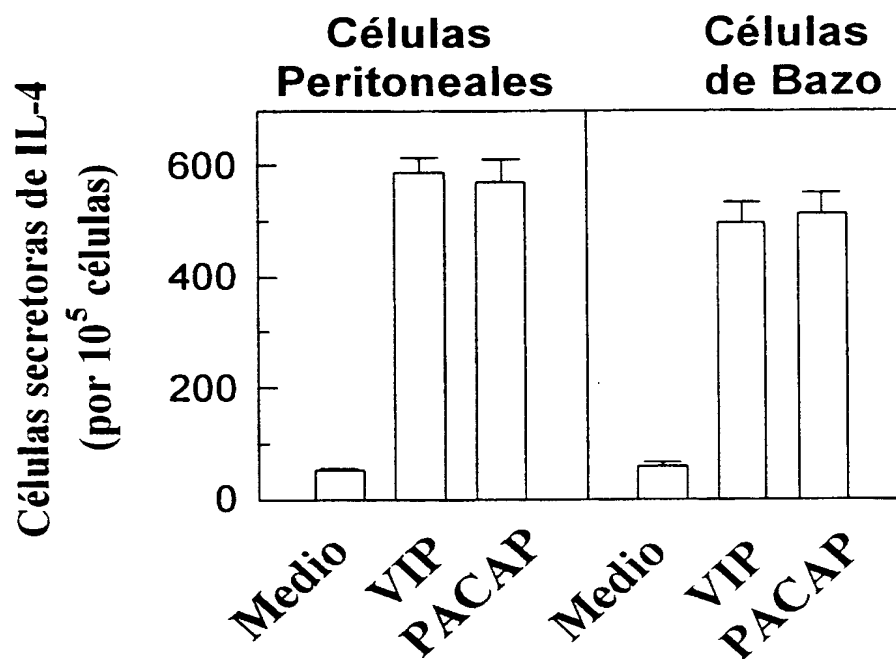


FIGURA 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**FIGURA 7**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/9

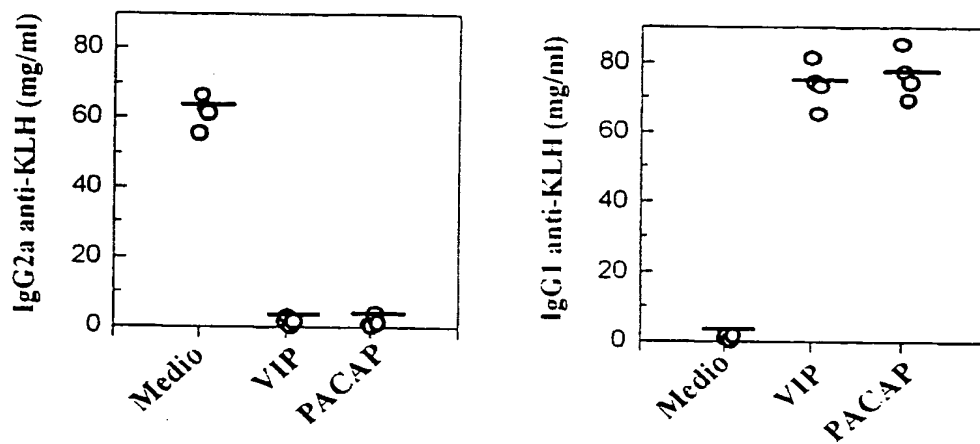


FIGURA 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9 / 9

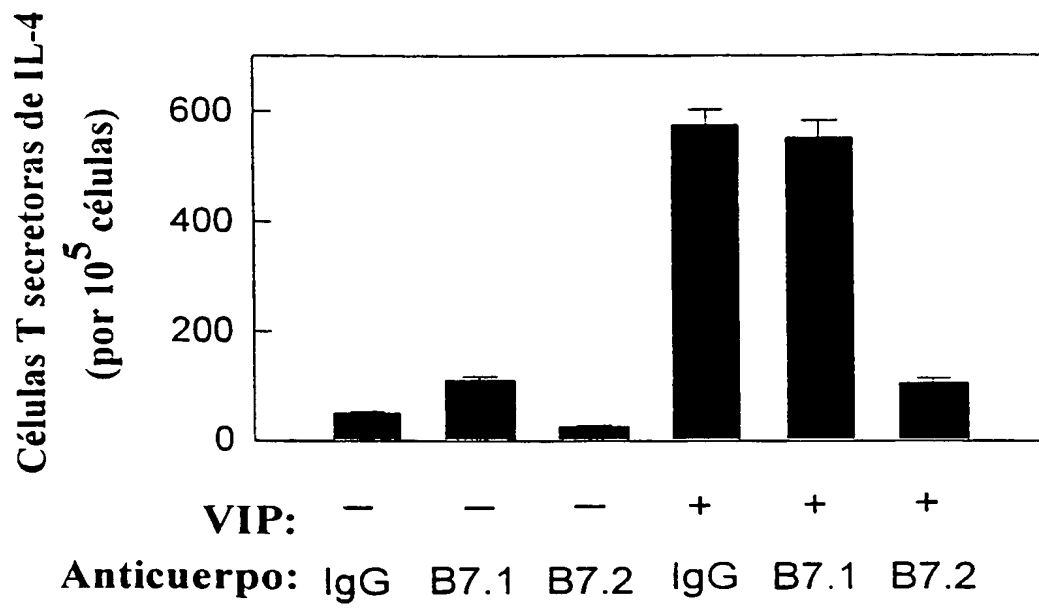


FIGURA 9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/ES 00/00197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K 38/22, A61P 37/02 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K, A61P, C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPODOC, WPIL, CA, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
E	WO 9953944 A1 (Universidad Ccomplutense de Madrid Rectorado), 28 October 1999 (28.10.1999), the whole document, specially claims 1-6	1-6		
X	GANEA, D. "Regulatory effects of vasoactive intestinal peptide on cytokine production in central and peripheral lymphoid organs". ADVANCES IN NEUROIMMUNOLOGY. 1996, Vol. 6, n 1, pages 61-74, The whole document	7-9		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 24 August 2000 (24.08.2000)		Date of mailing of the international search report 01 September 2000 (01.09.2000)		
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O.		Authorized officer Telephone No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 99/00197

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 00/00197

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 00/00197

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K 38/22, A61P 37/02

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K, A61P, C07K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPIL, CA, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
E	WO 9953944 A1 (Universidad Complutense de Madrid Rectorado), 28.10.1999, todo el documento, especialmente Reivindicaciones 1-6	1-6
X	GANEA, D. "Regulatory effects of vasoactive intestinal peptide on cytokine production in central and peripheral lymphoid organs". ADVANCES IN NEUROIMMUNOLOGY. 1996, Vol. 6, n° 1, páginas 61-74, todo el documento	7-9

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 24 Agosto 2000 (24.08.2000)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

01 SEP 2000 01.09.00

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

n° de teléfono + 34 91 3495552

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 99/00197

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 1 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°: 1-9 se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber: Aunque las reivindicaciones se refieren a un método de tratamiento terapéutico aplicado directamente al cuerpo humano, la búsqueda se ha realizado en relación a los efectos del compuesto/composición.
2. ☐ Las reivindicaciones n°: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional. a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°:

Indicación en cuanto a la reserva ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.
☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solitud internacional nº

PCT/ ES 00/00197

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9953944 A1	28.10.1999	AU 3148699 A	08.11.1999
		ES 2138561 A	01.01.2000
		EP 1002542 A	24.05.2000
-----	-----	-----	-----

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)